

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-330266

(43)Date of publication of application : 15.12.1998

(51)Int.Cl.

A61K 31/575
A23L 1/30
A61K 31/19
A61K 31/215
C07C 62/32
C07C 62/38
C07C 69/16
C07C 69/732
C07J 9/00
// A21D 13/08
A23G 3/00
A23G 3/30
A61K 35/84

(21)Application number : 09-143816

(71)Applicant : KOTAROU KANPO SEIYAKU KK
TOKYO MET GOV RINSHIYOU
IGAKU SOGO KENKYUSHO

(22)Date of filing : 02.06.1997

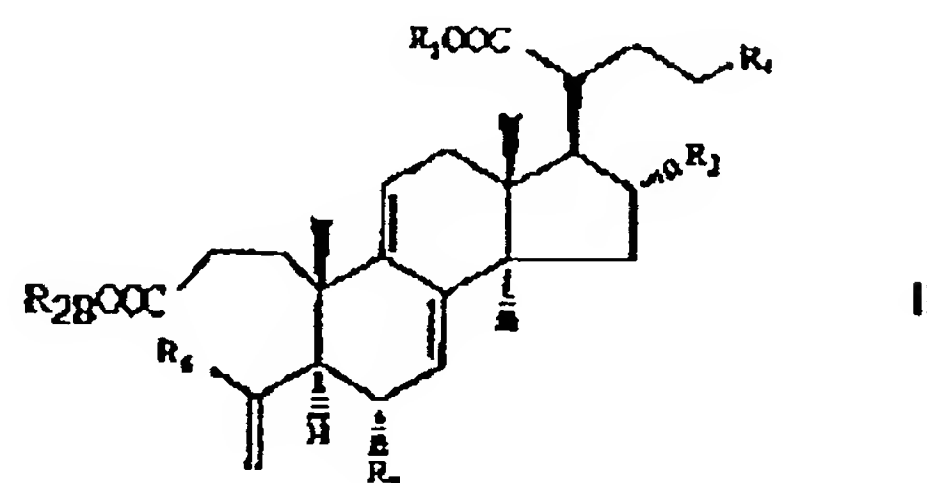
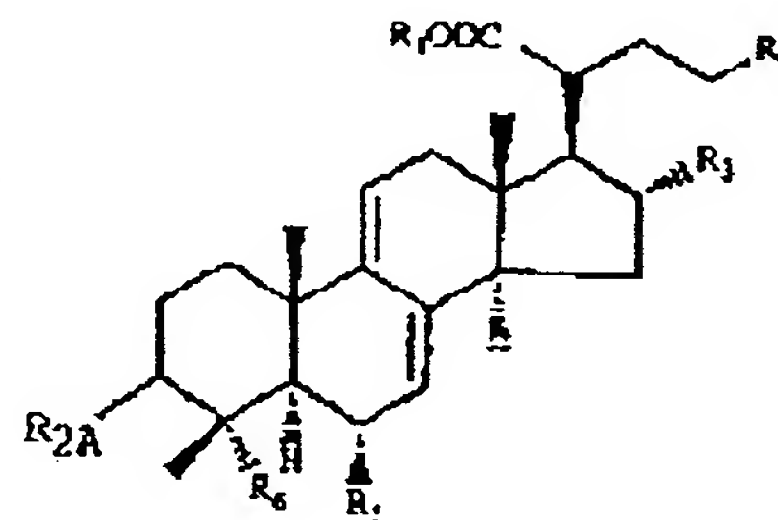
(72)Inventor : SATOU MAYUMI
TAI TAKAAKI

(54) COMPOSITION HAVING INSULIN ACTION-ENHANCING ACTIVITY

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a composition having activity for enhancing insulin action and differentiation-inducing activity by including a compound having lanostane skeleton or 3,4-secolanostane skeleton as an active ingredient.

SOLUTION: This composition has at least one kind of compound among compounds of formula I (R1 is H or CH3; R2A is β -OH, β -OCOCH3, α -OH, etc.; R3 is H or OH; R4 is C(=CH2)-C(CH3)2-Ra, etc.; Ra is H or OH; R6 is CH3 or CH2OH), etc., and compounds of formula II (R2B is H or CH3; R5 is H or OH). The compound of formula I includes e.g. polyporenic acid C or 3-O-acetyl-16 α -hydroxytrametenolic acid and the compound of formula II includes e.g. polycocic acid A. These compounds are obtained by extracting Hoelen or dried skin of pachyma hoelen which is a crude medicine. These compounds or the extracts are used as compositions such as pharmaceutical preparations, preparations for external uses, cosmetic compositions, functional foods or health foods.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than

BEST AVAILABLE COPY

the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-330266

(43)公開日 平成10年(1998)12月15日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
A 6 1 K 31/575	A E D	A 6 1 K 31/575 A E D
A 2 3 L 1/30		A 2 3 L 1/30 Z
A 6 1 K 31/19	A D S	A 6 1 K 31/19 A D S
31/215		31/215
C 0 7 C 62/32		C 0 7 C 62/32

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 16 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平9-143816	(71)出願人	390003757 小太郎漢方製薬株式会社 大阪府大阪市北区中津 2 丁目 5 番 23 号
(22)出願日	平成 9 年 (1997) 6 月 2 日	(71)出願人	591063394 財団法人東京都臨床医学総合研究所 東京都文京区本駒込 3 丁目 18 番 22 号
		(72)発明者	佐藤 真友美 埼玉県飯能市双柳452番地 9 号
		(72)発明者	田井 孝明 大阪府池田市八王寺 1 - 8 - 204 - 403
		(74)代理人	弁理士 青山 葆 (外 2 名)

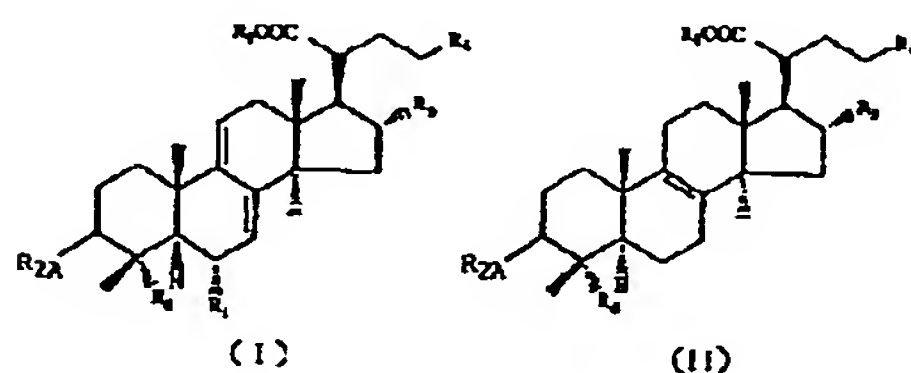
(54)【発明の名称】 インスリン作用増強活性組成物

(57)【要約】

【課題】 本発明は、ラノスタン骨格または 3, 4-セコラノスタン骨格を有する化合物の少なくとも一種を有効成分とするインスリン作用増強活性および分化誘導活性を有する組成物に関する。

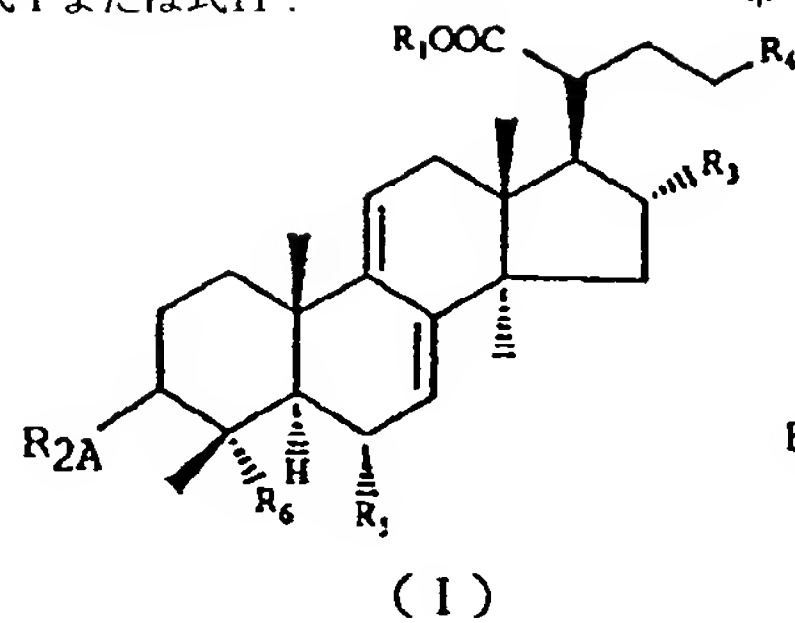
【解決手段】 式 I または式 II :

【化 1】



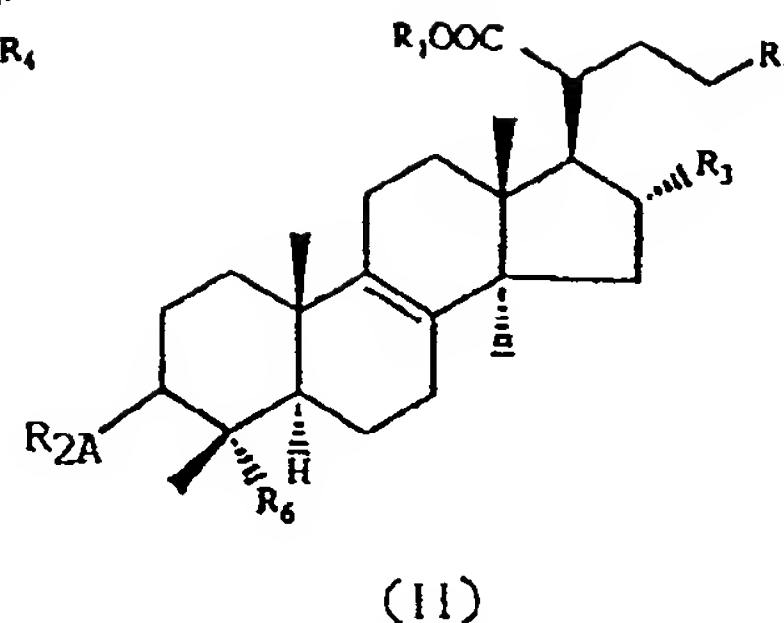
【特許請求の範囲】

【請求項1】 式Iまたは式II:



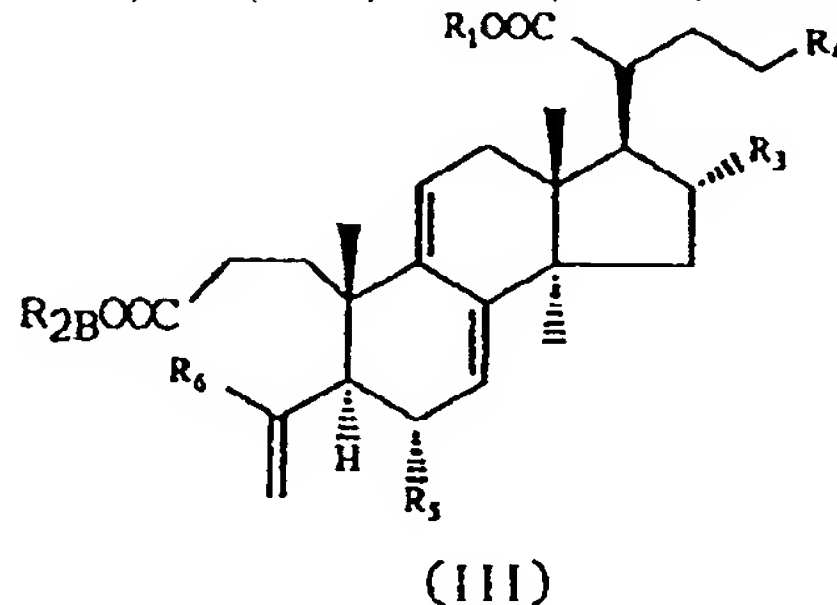
【式中、 R_1 は、H、または CH_3 であり、
 R_{2A} は、 $\beta-OH$ 、 $\beta-OCOCH_3$ 、 $\alpha-OH$ 、 $\alpha-OCOCH_3$ であるか、または環を構成する炭素原子とともに $C=O$ を形成し、
 R_3 および R_5 は、同一または異なって、H、またはOHであり、
 R_4 は、 $-C(=CH_2)-C(CH_3)_2-R_a$ (ここで、 R_a ※

*【化1】

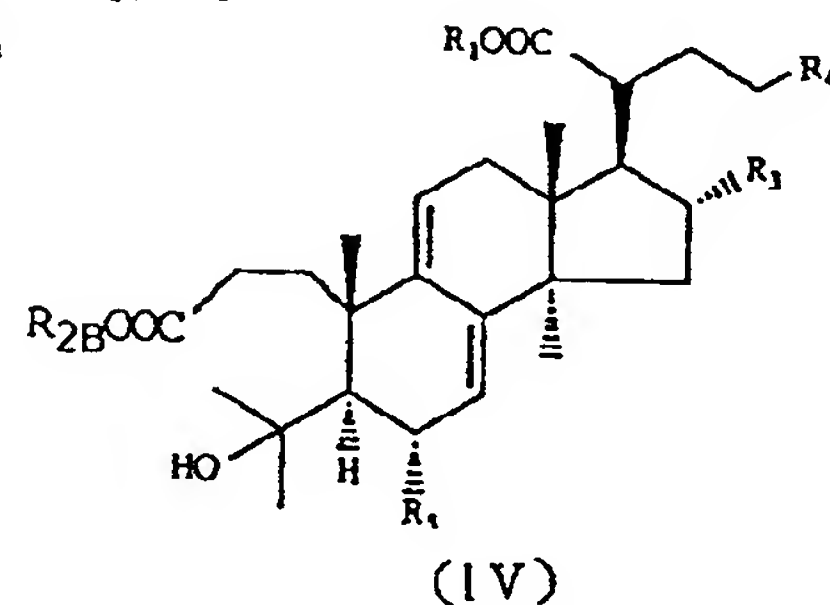


※は、HまたはOHを示す)、または $-CH=C(CH_3)-R_b$ (ここで、 R_b は、 CH_3 または CH_2OH を示す)であり、
 R_6 は、 CH_3 、または CH_2OH である。】で示されるラノスタン骨格を有するトリテルペン類の少なくとも1種、または、式IIIまたは式IV:

【化2】



【式中、 R_1 および R_{2B} は、H、または CH_3 であり、
 R_3 および R_5 は、同一または異なって、H、またはOHであり、
 R_4 は、 $-C(=CH_2)-C(CH_3)_2-R_a$ (ここで、 R_a は、HまたはOHを示す)、または $-CH=C(CH_3)-R_b$ (ここで、 R_b は、 CH_3 または CH_2OH を示す)であり、
 R_6 は、 CH_3 、または CH_2OH である】で示される3,4-セコラノスタン骨格を有するトリテルペン類の少なくとも1種を有効成分として含むインスリン作用増強活性を有する組成物。

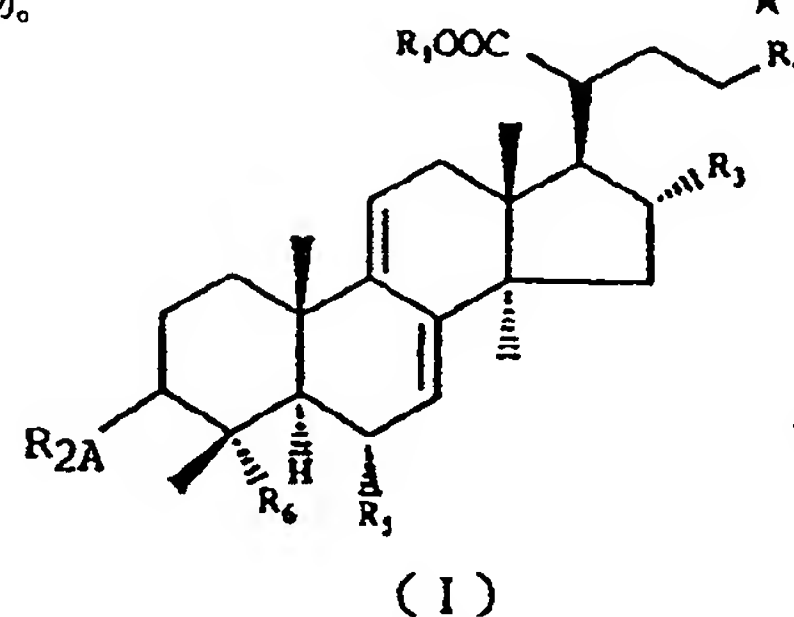


★【請求項2】 上記ラノスタン骨格を有するトリテルペン類が、ポリポレン酸C、パキマ酸、デヒドロパキマ酸、3-O-アセチル-16 α -ヒドロキシメテノール酸、デヒドロトラメテノール酸、または上記3,4-セコラノスタン骨格を有するトリテルペン類が、ポリコ酸A、ポリコ酸Bもしくはポリコ酸Dである、請求項1記載の組成物。

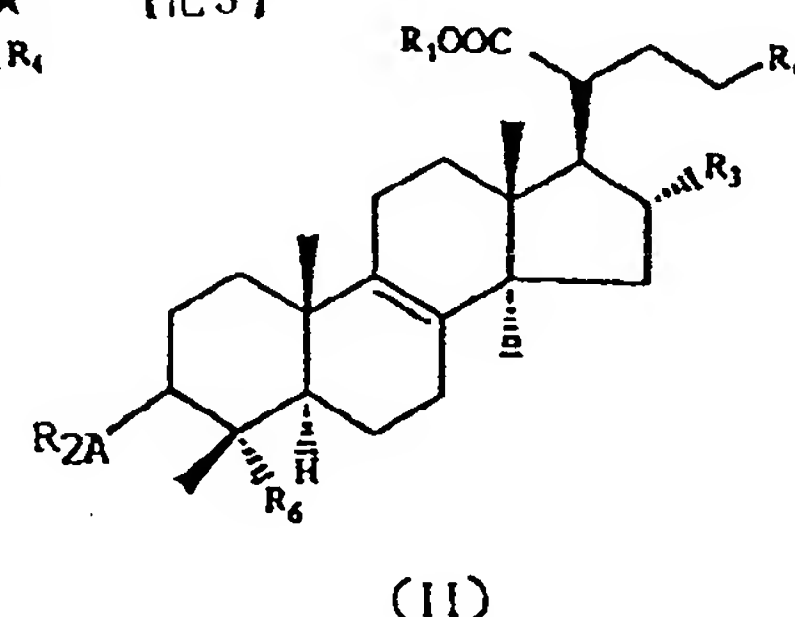
【請求項3】 茯苓または茯苓皮の抽出エキスを有効成分とするインスリン作用増強活性を有する組成物。

【請求項4】 式Iまたは式II:

【化3】

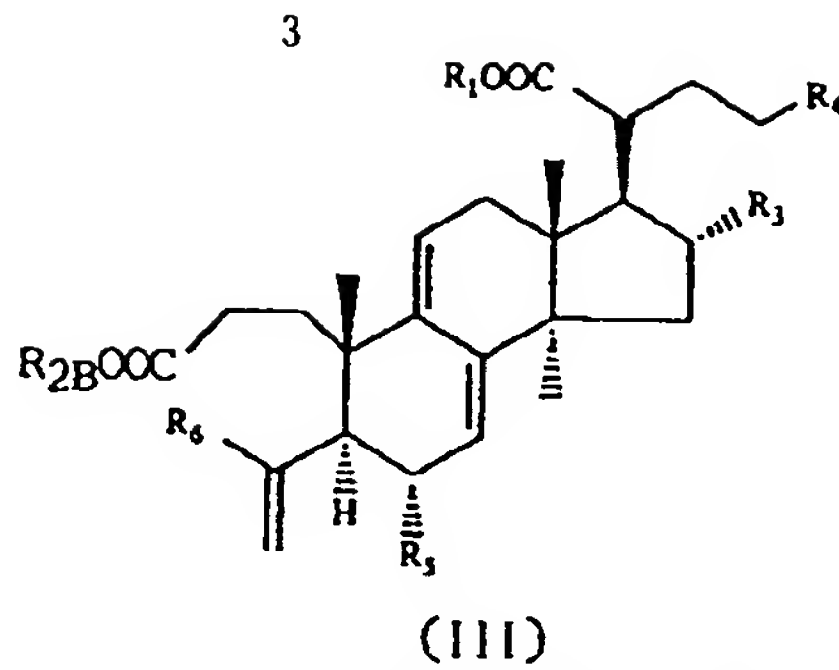


【式中、 R_1 、 R_{2A} 、 R_3 、 R_4 、 R_5 および R_6 は、前記と同じ意味である】で示されるラノスタン骨格を有するトリテルペン類の少なくとも1種、または式IIIまたは



式IV:

【化4】



【式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 および R_6 は、前記と同じ意味である】で示される3,4-セコラノスタン骨格を有するトリテルペン類の少なくとも1種を有効成分として含む分化誘導活性を有する組成物。

【請求項5】 上記ラノスタン骨格を有するトリテルペン類が、ポリボレン酸C、パキマ酸、デヒドロパキマ酸、3-O-アセチル-16 α -ヒドロキシメテノール酸、デヒドロトラメテノール酸、または上記3,4-セコラノスタン骨格を有するトリテルペン類が、ポリコ酸A、ポリコ酸Bもしくはポリコ酸Dである、請求項1記載の組成物。

【請求項6】 有効成分として茯苓または茯苓皮の抽出エキスを含む、分化誘導活性を有する組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

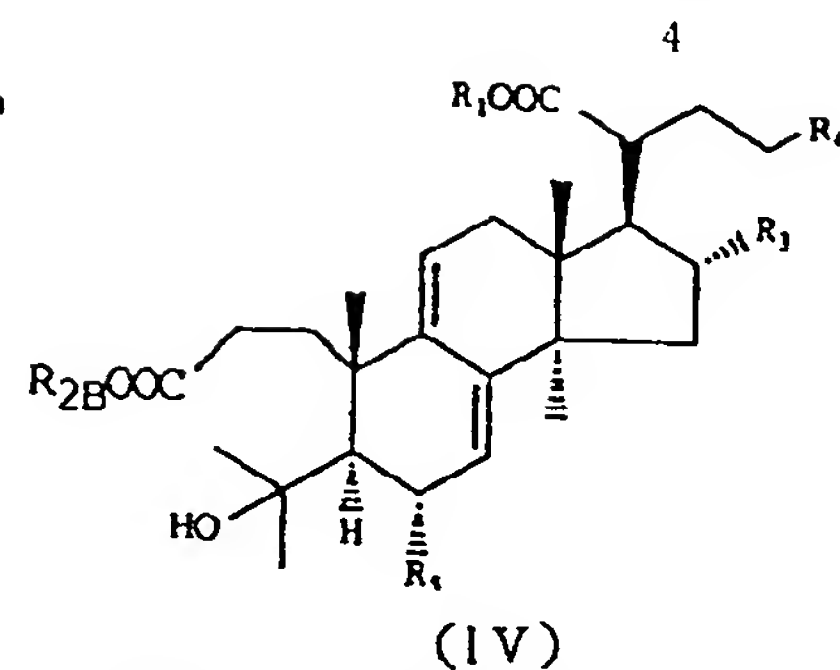
【発明の属する技術分野】本発明は、ラノスタン骨格または3,4-セコラノスタン骨格を有する化合物の少なくとも一種を有効成分とするインスリン作用増強活性および分化誘導活性を有する組成物、例えば、医薬製剤、化粧用組成物、機能性食品、健康食品など、に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】細胞が全能性を失いながら特殊な組織に分化することを細胞の発生運命という。そのプログラムは、受精卵の遺伝子にすでに書き込まれていたはずであるが、発生に伴って特定の遺伝子のスイッチがオン、オフされる制御機構は以前なぞのままである。遺伝子レベルでは、細胞分化とは遺伝子発現の型が変化することであり、多くの遺伝子の発現が一定のプログラムに従って遷移し分化した細胞としての形質を備えるようになる。

【0003】脂肪細胞は、筋肉、軟骨、骨などを生じる中胚葉性の幹細胞から特定の分化プログラムの活性化によって誘導されるが、その遺伝子発現制御の機構について、細胞の分化を制御するキーポイントの転写因子がPPAR (peroxisome proliferator-activated receptor: ペルオキシソーム増殖剤応答性レセプター) であることが明確になってきた。

【0004】ところで、この発明者らはインスリン非依存型糖尿病 (NIDDM: non-insulin-dependent diabetes) に対する治療薬として大きな期待を集めているシグリタゾン誘導体 (TZD) がインスリンの存在下前脂



肪細胞の分化を強く誘導することを見つけた。TZDによる活性化はPPARに特異的であり、PPAR γ への親和性の強さが血糖降下作用の強さおよび脂肪細胞の分化誘導活性の強さに相関することが判明している。すなわち、糖尿病治療薬の評価の1つとしての指標となし得ることになる。

【0005】そこで、この発明者らは、シグリタゾン誘導体のように、インスリンの存在下脂肪細胞の分化を誘導するもののなかに糖尿病治療薬としての作用を持つものがあると考えた。白色脂肪細胞ST-13前脂肪細胞株を用いて、植物成分の分化誘導活性をスクリーニングするうちに、茯苓成分に強い分化誘導活性があることを知った。

【0006】日本産および中国産の茯苓は伐採後3~5年を経た枯れたマツ類 (*Pinus* spp., アカマツなど) の根の周囲に生じるサルノコシカケ科の菌類マツホド (*Poriacocos* Wolf) を基原とするものである。その他の外国産茯苓はマツ属のほか、ヒマラヤスギ、カシ、ウルシ、その他の植物を宿主とする。不定形の塊状で表面は暗褐色で松膚状、内部は白色または淡紅色である。菌核の外層をはいで乾燥したものが茯苓である。味はやや粘稠性で新鮮なものは特異な微かなにおいがある。漢方では利水、鎮静薬として、利尿異常、心悸亢進などの治療に用いられている。本発明において分離精製された6種の化合物はすでに知られているが、これらの化合物が分化誘導活性を有することはかつて報告されていない。

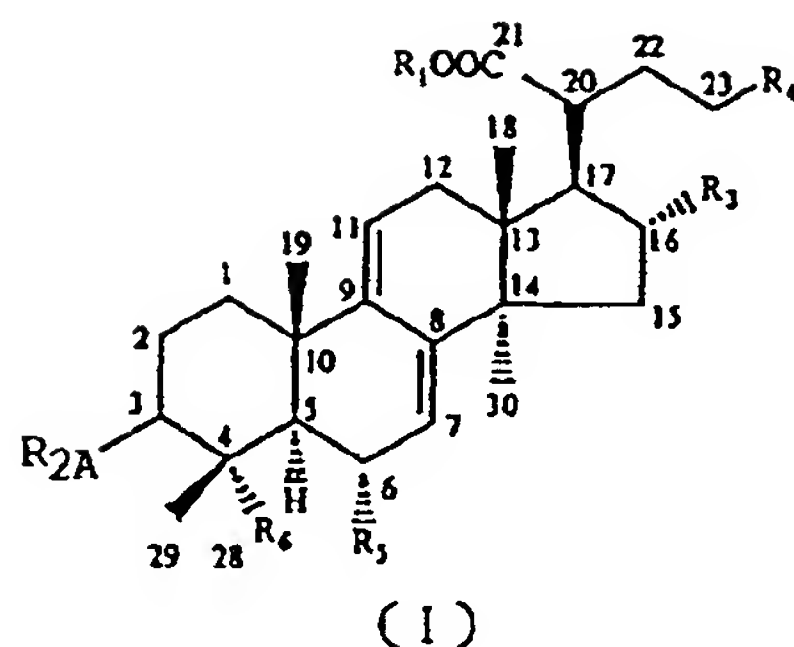
【0007】白色脂肪細胞ST-13前脂肪細胞株はdNマウス自然発生乳がんの同系移植細胞第2代の腫瘍より分離樹立された前脂肪細胞から脂肪細胞に分化するクローン化細胞株である。ウシ胎児血清とインスリンなどの分化誘導因子の存在下飽和密度に到達すると、細胞質内に急速に脂肪を蓄積し脂肪細胞へと分化誘導が可能であることが知られている。

【0008】本発明の化合物はインスリンの分化誘導活性を増強させると同時に化合物それ自体も分化誘導活性を有する。

【0009】

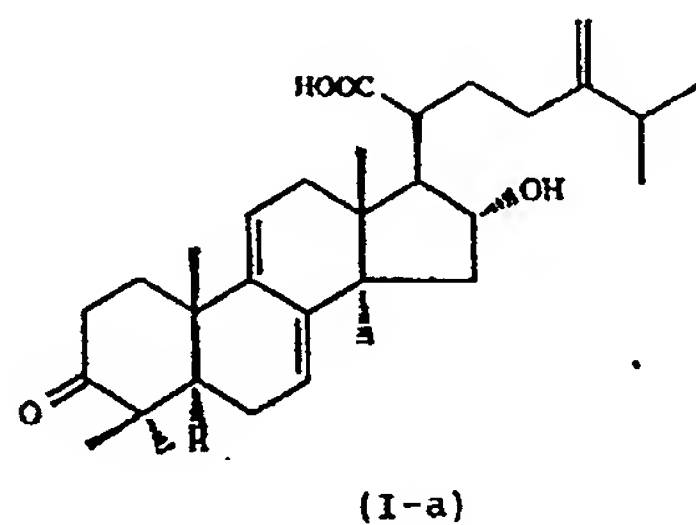
【課題を解決するための手段】本発明のインスリン作用増強活性または分化誘導活性を有する組成物は下記の化合物を有効成分として含むものである。ラノスタン骨格を有する、式Iまたは式II:

【化5】



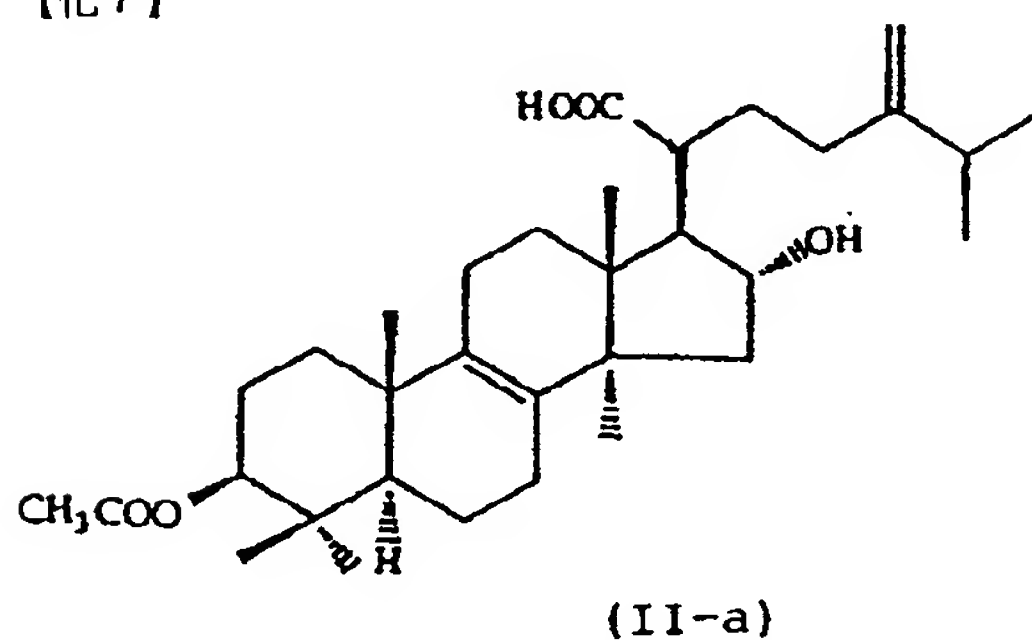
[式中、 R_1 は、H、または CH_3 であり、 R_{2A} は、 $\beta-OH$ 、 $\beta-OCOCH_3$ 、 $\alpha-OH$ 、 $\alpha-OCOCH_3$ であるか、または環を構成する炭素原子とともに $C=O$ を形成し、 R_3 および R_5 は、同一または異なって、H、またはOHであり、 R_4 は、 $-C(=CH_2)-C(CH_3)_2-R_a$ (ここで、 R_a は、HまたはOHを示す)、または $-CH=C(CH_3)-R_b$ (ここで、 R_b は、 CH_3 または CH_2OH を示す) であり、 R_6 は、 CH_3 、または CH_2OH である。] で示されるトリテルペン類であり、さらに

【化6】



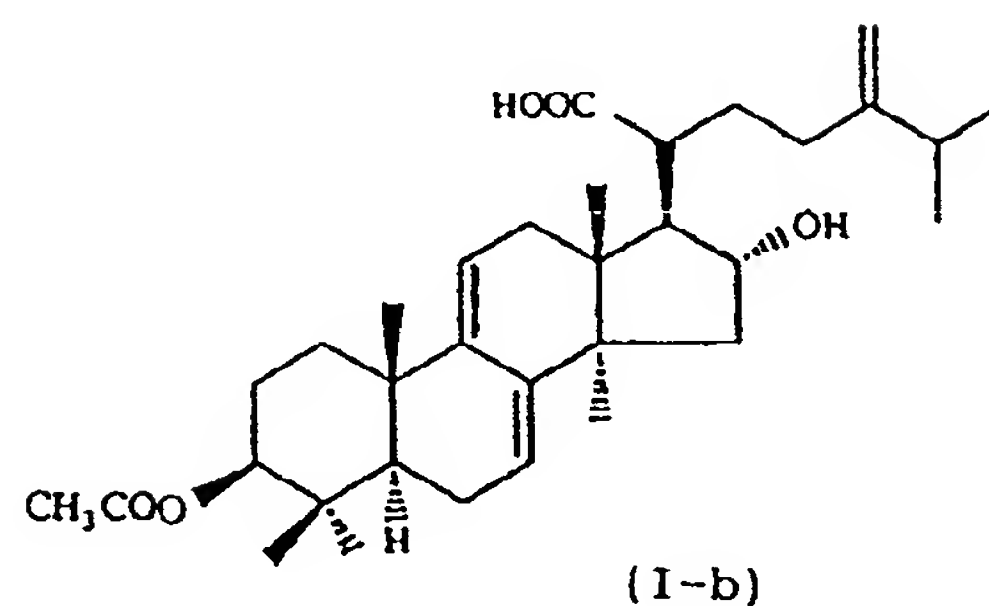
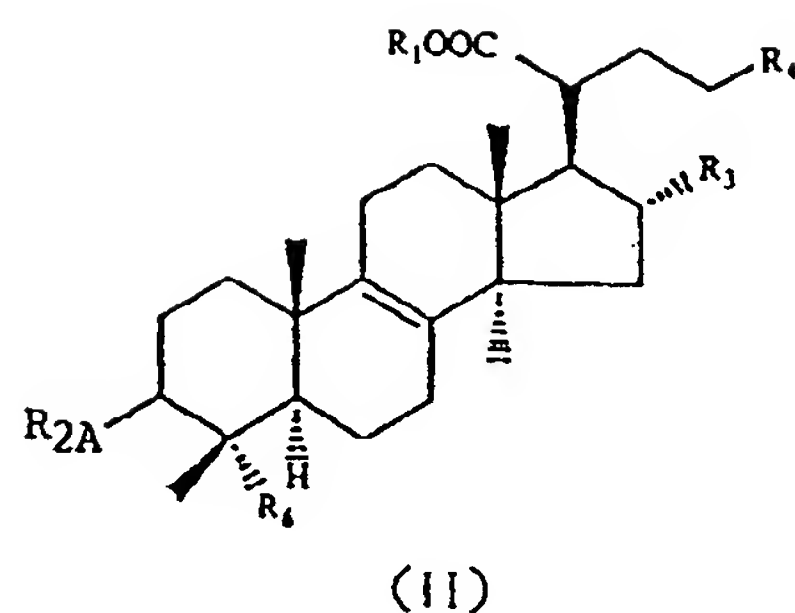
で示されるポリポレン酸C、式II-a :

【化7】



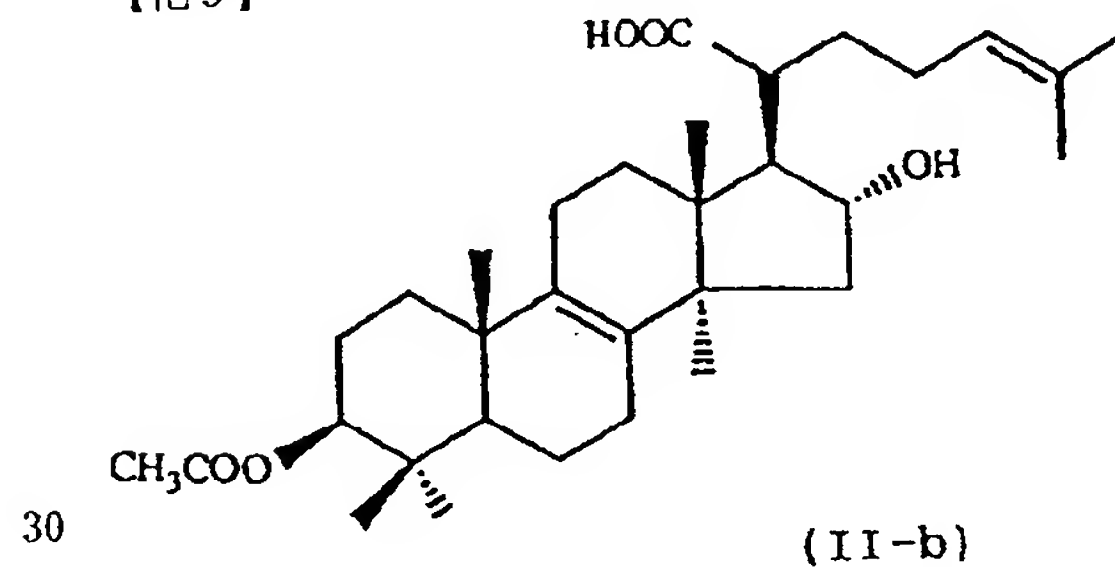
で示されるパキマ酸、式I-b :

【化8】

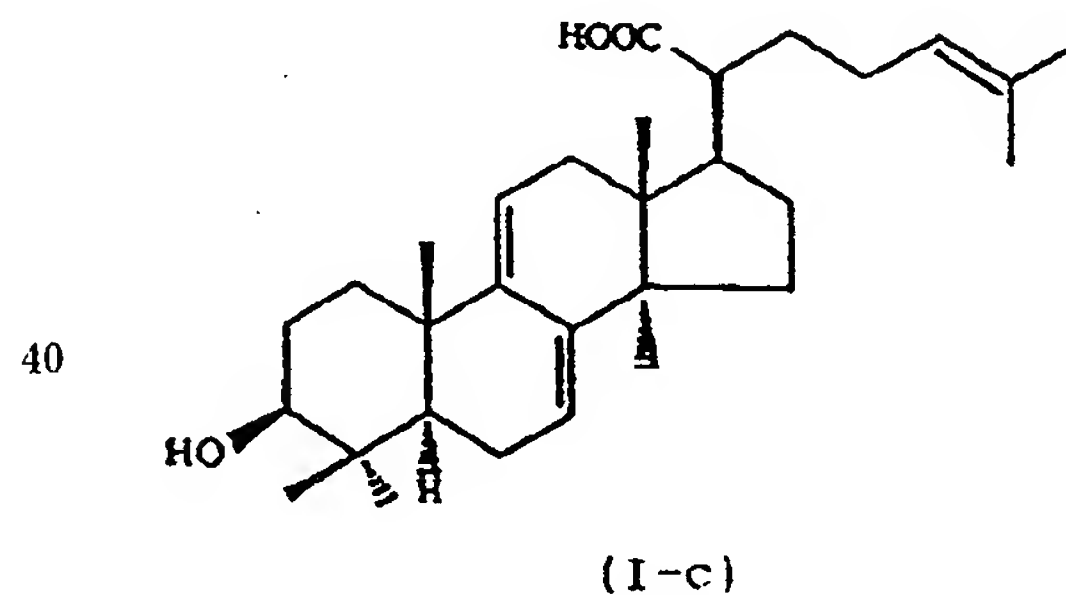


で示されるデヒドロパキマ酸、式II-b :

【化9】

で示される3-O-アセチル-16 α -ヒドロキシトラメテノール酸、および式I-c :

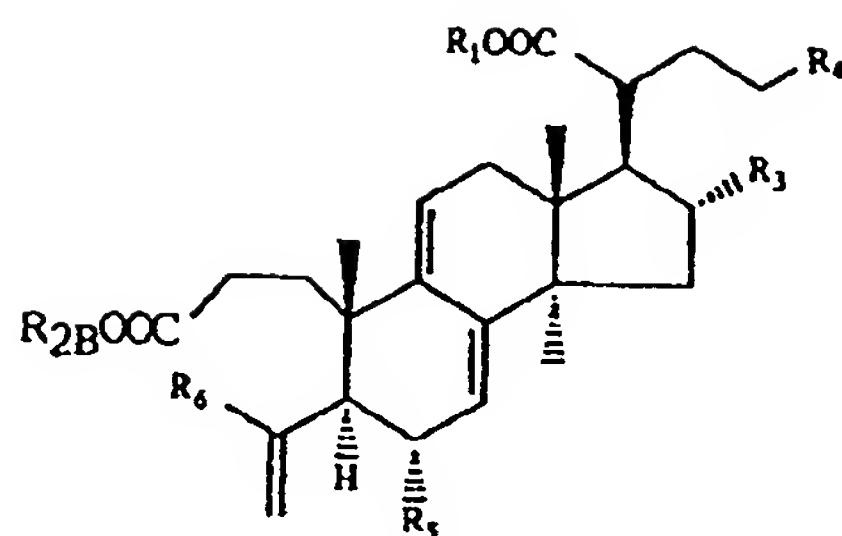
【化10】



で示されるデヒドロトラメテノール酸 (3 β -ヒドロキシシラノスター-7, 9(11), 24-トリエン-21-オイックアシッド) を挙げることができる。好ましくは、パキマ酸およびデヒドロトラメテノール酸である。

【0010】さらに、3, 4-セコラノスタン骨格を有する、式IIIまたは式IV :

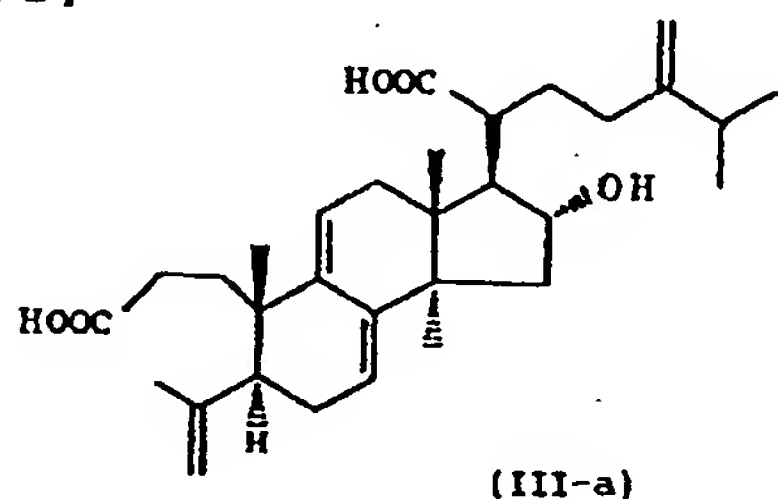
【化11】



(III)

【式中、 R_1 および R_2 は、H、または CH_3 であり、 R_3 および R_5 は、同一または異なって、H、またはOHであり、 R_4 は、 $-C(=CH_2)-C(CH_3)_2-Ra$ （ここで、 Ra は、HまたはOHを示す）、または $-CH=C(CH_3)-Rb$ （ここで、 Rb は、 CH_3 または CH_2OH を示す）であり、 R_6 は、 CH_3 、または CH_2OH である】で示されるトリテルペン類、さらに具体的には、例えば、式III-a：

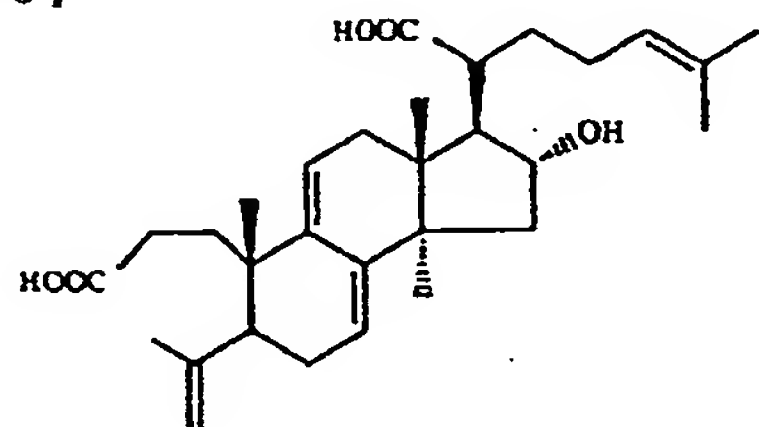
【化12】



(III-a)

で示されるポリコ酸A、式III-b：

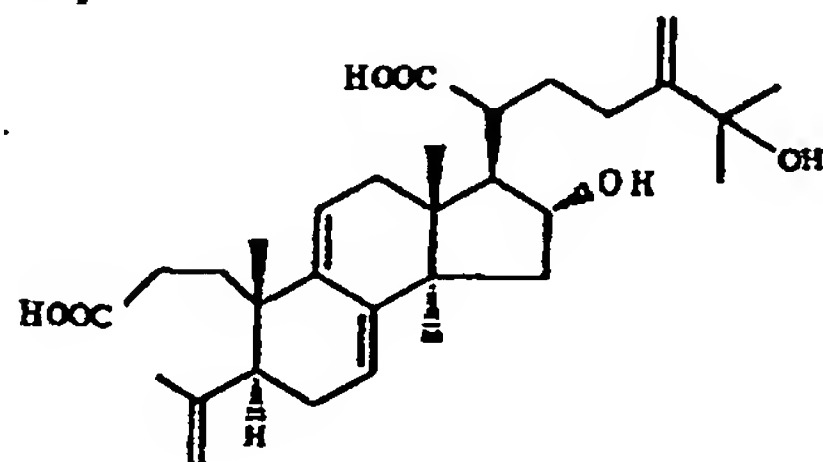
【化13】



(III-b)

で示されるポリコ酸B、式III-c：

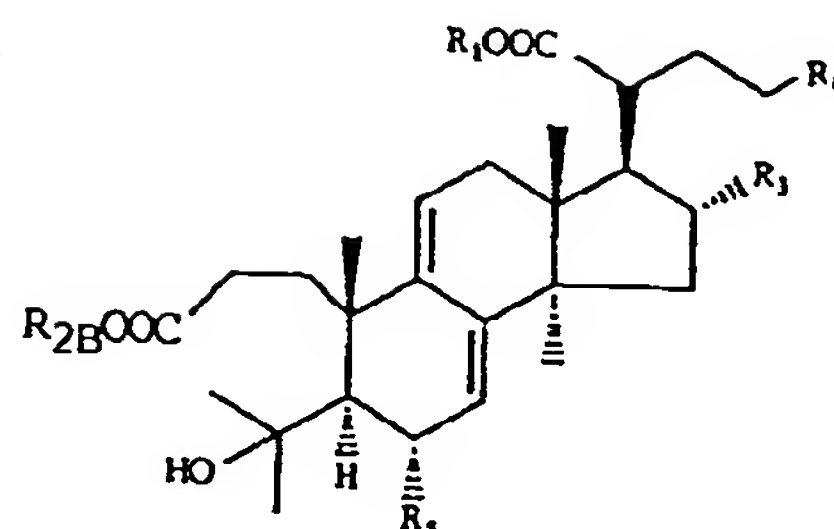
【化14】



(III-c)

で示されるポリコ酸Dを挙げることができる。

【0011】本発明の化合物には一般に生体内において遊離形と実質的に同様の生理活性または薬理活性を発揮するもの、例えば、本発明の化合物の誘導体および医薬



(IV)

的に許容される塩、付加塩、水和物などは本発明の技術的範囲に含まれるものである。例えば、酢酸エステル、メチル、エチルなどの低級アルキルエステルなどのエステル体、およびNa、Kなどの塩を挙げることができる。

【0012】本発明の組成物のインスリン作用増強活性および分化誘導活性を有する化合物としては、少なくとも式I～IVにおいて21位のカルボン酸またはその誘導体が有効であると推測される。

20 【0013】本発明はさらに、茯苓または茯苓皮の抽出エキスを有効成分とするインスリン作用増強活性および分化誘導活性を有する組成物に関する。

【0014】

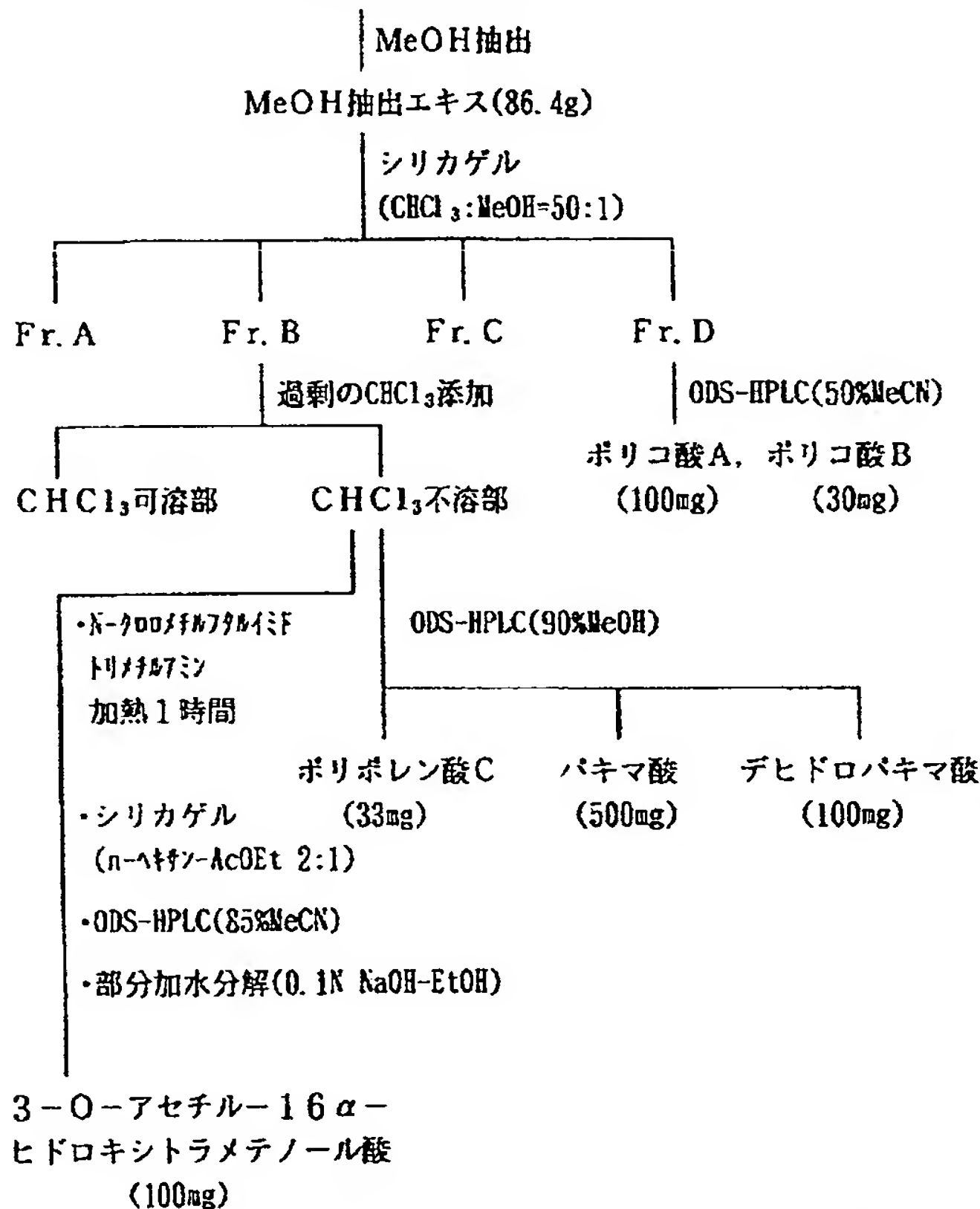
【発明の実施の形態】本発明の化合物および抽出エキ스는医薬製剤、外用剤、化粧用組成物、機能性食品、健康食品などの組成物として用いられ得る。医薬製剤、外用剤および化粧用組成物の例としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、注射剤、経皮吸収剤、軟膏剤、坐剤、ローション剤、クリーム剤など、機能性食品および健康食品の例としては、粉末、ペースト、細粒、顆粒、錠剤型保健食品、ドリンク剤、グミ製剤、クッキー、キャンデー（あめ）、ガムなどを挙げることができる。これらの組成物は通常用いられる製法によって製造され得る。

【0015】本発明では、茯苓だけでなく、通常は薬用として用いられない茯苓皮からも成分を抽出して本発明の化合物およびエキスを得ている。抽出溶媒としては、低級アルコール、例えば、メタノール、エタノール、プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、エチレングリコールならびにプロピレングリコールなど、およびこれらの水性媒体、エーテル、およびこれらの溶媒の混合物を挙げることができる。好ましくは、メタノール、エタノールまたはエーテルである。抽出溶媒がエタノールおよびエーテルである場合は上記活性を有する化合物がより選択的に抽出されるため、エタノールおよびエーテル抽出エキスは強いインスリン作用増強活性および分化誘導活性を示す。

【0016】本発明の化合物は、茯苓から例えば次のようにして得ることができる。市販の茯苓をメタノール、メタノールなどを含む水性溶媒、または水を用いて、還

流しながら1～3時間かけて抽出する。濾過後得られた抽出液を減圧下で溶媒を留去し、得られた抽出エキスを各種のクロマトグラフィーを用いて分離精製する。また場合によっては、N-クロロメチルフタリイミドによりエステル化を行ない、分離後、加水分解し精製する。また得られた化合物はエステル化、アシル化等で誘導体化する。例えば、ポリポレン酸C、パキマ酸、デヒドロパキマ酸、3-O-アセチル-16 α -ヒドロキシトラメ*

茯苓(15.0kg)



【0018】茯苓15kgを水浴上メタノールで還流しながら1時間抽出する。濾過後得られた抽出液を減圧下で溶媒留去し、メタノール抽出エキス86.4gを得た。ついで、内径12cm、長さ80cmのシリカゲルカラムクロマトを用い、クロロホルム-メタノール(50:1)で順次溶出し、フラクションA～Dを得た。フラクションAは過剰のクロロホルムを加えると沈殿を生じた。この沈殿物を90%メタノール溶液を溶媒として、逆相系分取高速液体クロマトグラフィーに繰り返し付し、ポリポレン酸C(33mg)、パキマ酸(500mg)およびデヒドロパキマ酸(100mg)を得た。さらにフラクションBの沈殿物の一部をアセトニトリルに懸濁し、N-クロロメチルフタリイミドとトリエチルアミンを加え1時間還流した。冷却後、減圧下にて溶媒留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトを用い、n-ヘキサン-酢酸エチル(2:1)で順次溶出し、メチルフタリイミドエステル体を得た。0.1N水酸化ナトリ

*テノール酸、ポリコ酸Aおよびポリコ酸Bは次のようにして分離精製する。

【0017】ポリポレン酸C、パキマ酸、デヒドロパキマ酸および3-O-アセチル-16 α -ヒドロキシトラメテノール酸の分離精製方法
分離精製操作を下記の表1に示す。

【表1】

ウム-エタノールで部分加水分解を行い、3-O-アセチル-16 α -ヒドロキシトラメテノール酸(100mg)を得た。

【0019】ポリコ酸Aおよびポリコ酸Bの分離精製方法(表1参照)

上記のフラクションDをさらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー及び逆相系分取高速液体クロマトグラフィーに繰り返し付し、ポリコ酸A(100mg)およびポリコ酸B(30mg)を得た。また、必要に応じ、通常用いられる適当な溶媒を使って再結晶による精製を行ってもよい。

【0020】ポリポレン酸C

無色針状結晶

mp: 273～275°

$[\alpha]_D^{25} + 2^\circ$ (ピリジン)

EI-MS (m/z): 482 [M⁺]

HR-MS (m/z): 482.3383 [M⁺] (C₃₁H₄₆)

O₅)

(計算値482.3398)

UV λ_{\max} (MeOH) nm: 242 (log ϵ = 4.25)IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 1710, 1680

【0021】パキマ酸

無色針状結晶

mp: 296~298°

デヒドロパキマ酸

無色針状晶

mp: 268~270°

[α]_D²⁵ +41° (ピリジン)EI-MS (m/z): 526 [M⁺], 508, 493, 433元素分析 C₃₃H₅₀O₅ 計算値 C; 75.25, H; 9.59

実測値 C; 75.04, H; 9.61

UV λ_{\max} (EtOH) nm: 242 (log ϵ = 4.10)IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 1730, 1680【0023】3-O-アセチル-16 α -ヒドロキシト

ラメテノール酸

無色針状晶

mp > 300°

[α]_D²⁵ +7° (ピリジン)EI-MS (m/z): 514 [M⁺], 481, 421, 316HR-MS (m/z): 514.3629 [M⁺] (C₃₂H₅₀O₅)

(計算値514.3658)

IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 1737, 1707

【0024】デヒドロトラメテノール酸

無色針状晶

mp 254-255°

[α]_D²⁵ +29° (ピリジン)EI-MS (m/z): 454 [M⁺], 436, 421HR-MS (m/z): 454.3453 [M⁺] (C₃₀H₄₆O₃)

(計算値: 454.3447)

UV λ_{\max} (EtOH) nm: 235 (log ϵ = 3.8), 242 (4.1), 253 (3.8)IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 1702

【0025】ポリコ酸A

無色針状晶

mp: 248~249°

[α]_D²⁵ +22° (メタノール)EI-MS (m/z): 498 [M⁺], 480, 425, 407HR-MS (m/z): 498.3362 [M⁺] (C₃₁H₄₆O₅)

(計算値498.3345)

UV λ_{\max} (EtOH) nm: 242 (log ϵ = 4.11)IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 1703, 1640

【0026】ポリコ酸B

* [α]_D²⁵ +6° (ピリジン)EI-MS (m/z): 528 [M⁺]HR-MS (m/z): 528.3826 [M⁺] (C₃₃H₅₂O₅)

(計算値528.3817)

IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 1730, 1680

* 【0022】

無晶形粉末

[α]_D +15° (メタノール)EI-MS (m/z): 484 [M⁺], 466, 411, 393HR-MS (m/z): 484.3123 [M⁺] (C₃₀H₄₄O₅)

(計算値484.3189)

UV λ_{\max} (EtOH) nm: 242 (log ϵ = 4.09)IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 1707, 1639

【0027】ポリコ酸D

無晶形粉末

[α]_D²⁵ +11° (メタノール)FAB-MS (m/z): 537 [M+Na]⁺30 UV λ_{\max} (log ϵ) nm: 235 (log ϵ = 3.8), 242 (4.1), 253 (3.8)IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 1710, 1639

【0028】分化誘導活性試験

細胞分化とは遺伝子発現の型が変化することであり、多くの遺伝子の発現が一定のプログラムに従って遷移し分化した細胞としての形質を備えるようになる。脂肪細胞の場合、分化にともなう最も顕著な形質変化は、脂肪代謝酵素の量と、その活性調節にかかわるホルモン受容-応答系の変動でありこれらは分化後期の指標となる。

40 【0029】本発明の化合物の分化誘導活性の試験に、分化後期のマーカーとして、トリアシルグリセロール染色(：細胞を中性ホルマリンで固定後oil red O染色すると細胞内に蓄積したトリアシルグリセロールが赤色に染まる)およびトリアシルグリセロールの定量(：細胞内のトリアシルグリセロールをイソプロピルアルコールで抽出し、アセチルアセトン法で定量する)を行った。

【0030】インスリン添加試験は、本発明の化合物の白色脂肪細胞ST-13前脂肪細胞株に対するインスリンの分化誘導活性に与える影響(インスリン作用増強活性)を試験するためのものであり、インスリン無添加試

験は本発明の化合物自体のST-13前脂肪細胞に対する分化誘導活性（インスリン様活性）を試験するためのものである。

【0031】A. トリアシルグリセロール染色

I. 材料

白色脂肪細胞ST-13前脂肪細胞株

パキマ酸	10^{-5} M
ポリコ酸A	10^{-5} M
デヒドロトラメテノール酸	10^{-5} M
茯苓皮メタノールエキス	0.1 μ g/mL
DMSO	0.1 %
シグリタゾン（陽性対照）	1 μ g/mL

対照 10 % FCS インスリン+, およびインスリン-

【0032】II. 結果

図1に示すように、コントロールは赤色に染色された細胞がないため、全く分化されていないことがわかる。一方、インスリンのみの添加では僅かに分化していることがわかる。DMSOおよびインスリン添加では、インスリン単独のときと変わらないため、DMSOは影響はない。陽性対照のシグリタゾンは、インスリンのみの添加※20

B. トリアシルグセロールの定量

I. 材料

白色脂肪細胞ST-13前脂肪細胞株

ポリコ酸 B	10^{-5} M、 10^{-6} M
ポリコ酸 D	10^{-5} M、 10^{-6} M
ポリコ酸 A	10^{-5} M、 10^{-6} M
ポリボレン酸 C	10^{-5} M、 10^{-6} M
3-O-アセチル-16 α -ヒドロキシトラメテノール酸	10^{-5} M、 10^{-6} M
デヒドロパキマ酸	10^{-5} M、 10^{-6} M
パキマ酸	10^{-5} M、 10^{-6} M
デヒドロトラメテノール酸	10^{-5} M、 10^{-6} M
茯苓エーテルエキス	10 μ g/mL、1 μ g/mL
茯苓エタノールエキス	10 μ g/mL、1 μ g/mL
茯苓水エキス	10 μ g/mL、1 μ g/mL
茯苓皮メタノールエキス	10 μ g/mL、1 μ g/mL
シグリタゾン	1 μ g/mL (3×10^{-6} M)、 0.1 μ g/mL (3×10^{-7} M)
DMSO	0.1 %、0.01 %

対照 10 % FCS インスリン+, およびインスリン-

【0034】II. 実験方法

(1) ST-13前脂肪細胞の継代培養

ST-13前脂肪細胞株はddNマウス自然発生乳癌の同系移植第2代の腫瘍より分離樹立された前脂肪細胞から脂肪細胞に分化するクローン化細胞株である。ST-13前脂肪細胞の継代培養方法は、培養液を吸引除去後、PBS (-) で2~3回洗浄し、トリプシン（採集濃度0.02 %）とEDTA（最終濃度0.05 %）を添加したPBS (-) で細胞を分散し継代培養液で培養した。

* 細胞を中性ホルマリンで固定後、oil red O（p-ジメチルアミノアゾベンゼン-O-カルボン酸を0.1 gとり、エタノール100mlに溶かす）で染色すると、細胞内に蓄積したトリアシルグリセロールは赤色に染まる。

※に比べて、赤色に染色された細胞が多く、インスリンの分化誘導作用を増強している。茯苓メタノールエキスもまたインスリンの分化誘導作用を増強している。同様に、パキマ酸、デヒドロトラメテノール酸、ポリコ酸Aにもインスリン作用増強活性が見られる。

【0033】

1. 継代培養液

2. DMEM（グルコース4500mg/mL）、HAM F-12、[DMEM: HAF A-12 = 1:1]

3. 10 % ウシ血清（胎児血清を用いると、血清中の未同定の分子誘導因子により脂肪細胞に分化するため、未分化な細胞として維持ができなくなる）

4. 硫酸カナマイシン（60 μ g/mL）

【0035】(2) ST-13前脂肪細胞の分化誘導

継代するときと同様に細胞を分散し、 3×10^3 / cm^2 の密度で継代培養液を用いて培養した。24時間後に誘導

培養液に交換した。この誘導培養液へ被験化合物 10^{-6} M、 10^{-5} M、エキ스는 $10 \mu\text{g/mL}$ 、 $1 \mu\text{g/mL}$ の濃度で 0.1% DMSO に溶解し、それぞれインスリン $5 \mu\text{g/mL}$ を添加した場合と添加しない場合で 2 週間培養した。細胞分化のマーカーとしては細胞内のトリアシルグリセロールをイソプロピルアルコールで抽出し、アセチルアセトン法で定量した。なお、陽性対照としてシグリタゾン $1 \mu\text{g/mL}$ (3×10^{-6} M)、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ (3×10^{-7} M) を用いた。

【0036】III. 結果

図2はST-13前脂肪細胞に対するインスリンの分化誘導活性に与える本発明の化合物の影響を示すものである。被験化合物が2列に記載されているのはそれぞれ濃度が異なるものを示し、左が 10^{-5} M であり、右は 10^{-6} M である。結果は被験物質の8種類の化合物すべての 10^{-5} M 濃度のポリコ酸B、ポリコ酸D、ポリコ酸A、ポリポレン酸C、3-O-アセチル-16 α -ヒドロキシトラメテノール酸、デヒドロパキマ酸、パキマ酸、デヒドロトラメテノール酸および茯苓エーテルエキス、茯苓エタノールエキス、茯苓皮メタノールエキスがインスリンの分化誘導活性を増大させることを示している。特に、ポリポレン酸C、パキマ酸、デヒドロトラメテノール酸、茯苓エーテルエキス、茯苓エタノールエキス、茯苓皮メタノールエキスには強い活性が観察される。

【0037】図3は本発明の被験物質自体のST-13前脂肪細胞に対する分化誘導活性を示すものである。 10^{-5} M のポリポレン酸C、パキマ酸およびデヒドロトラメテノール酸の3種の化合物および茯苓エーテルエキスは明らかな分化誘導活性を示している。特に、パキマ酸およびデヒドロトラメテノール酸は強い活性が観察されている。また、残りの5種の被験化合物および茯苓水エキスおよび茯苓皮メタノールエキスの分化誘導活性は濃度依存性であるから、濃度を上げることによって分化誘導活性を現し得ることを示している。

【0038】急性毒性試験

(1) 試験化合物

ポリコ酸A

(2) 試験方法

BDF₁ 雄性マウス 4 週令 5 匹を使用し、1 週間動物室で馴化後、18 時間絶食させてから試験化合物を 0.5 % CMC-Na に懸濁して、経口投与した（投与容量 $0.1 \text{ mL} / 10 \text{ g}$ 体重）。

(3) 試験結果

$1000 \text{ mg} / \text{kg}$ の用量をマウスに投与しても死亡例はなく、異常症状も認められなかった。従って、試験化合物の毒性は低い。

【0039】有効な投与量及び投与方法

本発明で用いられる化合物はそのまま、あるいは慣用の製剤担体と共に動物及び人に投与することができる。本発明の組成物の投与形態としては、特に限定がなく、必

要に応じ適宜選択して使用することができ、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤等の経口剤、注射剤、経皮吸収剤、ローション剤、クリーム剤、軟膏剤、坐剤等の非経口剤が挙げられる。

【0040】経口剤としての有効量は、患者の年齢、体重、疾患の程度により異なるが、通常成人で本発明の化合物の重量として $1 \text{ mg} \sim 1 \text{ g}$ 、好ましくは $10 \text{ mg} \sim 500 \text{ mg}$ を、1 日数回に分けての服用が適当である。経口剤は、例えば、乳糖、デンプン、ショ糖、ブドウ糖、マンニトール、コンスターチ、無機塩類等を用いて常法に従って製造される。

【0041】これらの製剤には、必要に応じて上記の賦形剤の他に、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、乳化剤、滑沢剤、湿潤剤、流動化剤、保存剤、矯味剤、着色剤、香料等を使用することができる。

【0042】例えば、結合剤にはデンプン、デキストリン、アラビアゴム末、ヒドロキシプロピルスターチ、結晶セルロース、エチルセルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドンを挙げることができる。

【0043】崩壊剤としては、デンプン、ヒドロキシプロピルスターチ、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カルボキシメチルセルロース、低置換ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドンがある。

【0044】界面活性剤としては、ラウリル硫酸ナトリウム、大豆レシチン、卵黄レシチン、ショ糖脂肪酸エステル、ポリソルベート 80 が挙げられる。

【0045】滑沢剤の例には、タルク、ロウ類、水素添加植物油、ショ糖脂肪酸エステル、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸アルミニウムがある。

【0046】流動化剤としては、軽質無水ケイ酸、乾燥水酸化アルミニウムゲル、合成ケイ酸アルミニウム、ケイ酸マグネシウムを挙げることができる。

【0047】また、本発明の化合物は、懸濁液、乳化剤、シロップ剤、エリキシル剤としても投与することができ、これらの剤形には、矯味矯臭剤、着色剤が含まれていてもよい。

【0048】本発明の組成物は、さらに、食品の形態としても摂取され得、例えば、クッキー、グミ、ガムなどの形態でもよい。これらの食品は通常の製造方法によって製造することができる。

【0049】非経口剤として発癌予防効果を発揮するためには、患者の年齢、体重、疾患の程度により異なるが、通常成人で本発明の化合物の重量として 1 日 $0.1 \text{ mg} \sim 5 \text{ mg}$ までの皮下注射、筋肉注射が適当と思われる。

【0050】この非経口剤は常法に従って製造され、希

10

20

30

40

50

釈剤として一般に注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、落花生油、大豆油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等を用いることができる。さらに必要に応じて、殺菌剤、防腐剤、安定剤等を加えてもよい。

【0051】その他の非経口剤としては、外用液剤、ゲル状軟膏等の経皮吸収剤、直腸内投与のための坐剤等が挙げられ、常法に従って製造される。

【0052】例えば、ローション剤には、通常用いられる添加剤が含まれていてもよく、懸濁剤として、アラビアゴム、トラガント、デキストリン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、カルボキシビニルポリマー、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ベントナイト、ビーガム、無水ケイ酸等が挙げられる。

【0053】乳化剤として、石ケン、ラウリル硫酸ナトリウム、ソルビタン、脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、モノグリセリド等が挙げられる。

【0054】湿潤剤として、グリセリン、プロピレングリコール、ソルビトール、1, 3-ブチレングリコール、dl-ピロリドンカルボン酸、乳酸ナトリウム等が挙げられる。

【0055】保存剤として、パラオキシ安息香酸エステル類、塩化ベンザルコニウム等が挙げられる。これらを用いて、常法に従ってローション剤を調製する。

【0056】次に、本発明の製剤例を示して、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれにより何ら制限されるものではない。

【0057】

実施例1

ポリボレン酸C	10g
乳糖	62g
デンプン	20g
カルボキシメチルセルロースカルシウム	5g
軽質無水ケイ酸	2g
ステアリン酸マグネシウム	1g
計	100g

上記の処方に従って均一に混合し、打錠機にて圧縮成形して一錠200mgの錠剤を得た。この錠剤一錠には、ポリボレン酸Cが20mg含まれており、成人一日3～6錠を数回に分けて服用する。

【0058】

実施例2

①ポリコ酸A	10g
②結晶セルロース	30g
③乳糖	52g
④カルボキシメチルセルロースカルシウム	5g
⑤軽質無水ケイ酸	2g
⑥ステアリン酸マグネシウム	1g
計	100g

上記の処方に従って①、③、⑤および⑥の一部を均一に混合し、成形圧縮した後、粉碎し、②、④および⑥の残量を加えて混合し、打錠機にて圧縮成形して一錠200mgの錠剤を得た。この錠剤一錠には、ポリコ酸Aが20mg含まれており、成人一日3～6錠を数回に分けて服用する。

【0059】

実施例3

パキマ酸	2g
デキストリン	71g
結晶セルロース	20g
7%ヒドロキシプロピルセルロース溶液	20g
計	113g

上記の処方に従って均一に混合し、ねつ和した。押し出し造粒機により造粒後、乾燥し、12号のふるいを通して顆粒剤を得た。この顆粒剤1gにはパキマ酸が20mg含まれており、成人1日3～6gを数回に分けて服用する。

【0060】

実施例4

デヒドロパキマ酸	2g
デキストリン	73g
結晶セルロース	20g
軽質無水ケイ酸	4g
ステアリン酸マグネシウム	1g
計	100g

上記の処方に従って均一に混合し、圧縮成形機で圧縮成形後、破碎機で碎き、30号のふるいを通して細粒剤を得た。この細粒剤1gにはデヒドロパキマ酸が20mg含まれており、成人1日3～6gを数回に分けて服用する。

【0061】

実施例5

ポリボレン酸C	9g
コンスターチ	77g
結晶セルロース	10g
軽質無水ケイ酸	3g
ステアリン酸マグネシウム	1g
計	100g

上記の処方に従って均一に混合し、220mgを2号カプセルに充填した。このカプセル剤1粒には、ポリボレン酸Cが20mg含まれており、成人1日3～6粒を数

回に分けて服用する。

【0062】

実施例6

①ポリコ酸A	1 g
②注射用蒸留水	92 g
③オリーブ油	5 g
④大豆リン脂質	2 g
計	100 g

上記の処方に従って①を③と④に溶解し、これに②を加えて乳化し、注射剤を得た。

【0063】

実施例7

①パキマ酸	1 g
②プロピレングリコール	20 g
③エタノール	30 g
④カルメロースナトリウム	1 g
⑤精製水	48 g
計	100 g

上記の処方に従って①に②と③を加えて混合する。これに別に④を⑤の1部で膨潤させたものに加え均一に混和*20

実施例9

①3-〇-アセチル-16 α -ヒドロキシトラメテノール酸	1.0 g
②サラシミツロウ	0.1 g
③セタノール	1.5 g
④ラウリル硫酸ナトリウム	0.5 g
⑤グリセリン	5.0 g
⑥パラオキシ安息香酸メチル	0.2 g
⑦パラオキシ安息香酸プロピル	0.2 g
⑧精製水	適量
計	100.0 g

上記の処方に従って、原料①、②、③、⑥および⑦を水浴上で約70℃に加温して溶かす。別に④および⑤を全量の約2/3容量の精製水に溶かし、これを約70℃に加温し、この混液を絶えずかきまぜつつある油相中に加え、40℃になるまでかきまぜたのち、残りの精製水を※

実施例10

クリーム剤

(1)ポリコ酸B	1.0 g
(2)スクワラン	10.0 g
(3)ミリスチン酸イソプロピル	7.0 g
(4)ベヘニルアルコール	1.0 g
(5)セトステアリアルアルコール	5.5 g
(6)ステアリン酸モノグリセリン	2.0 g
(7)d- α -トコフェロール	0.05 g
(8)POE(20)モノステアリン酸ソルビタン	2.0 g
(9)キサントガム	0.1 g
(10)1,3-ブチレングリコール	2.0 g
(11)グリセリン	3.0 g
(12)ソルビトール	5.0 g
(13)パラベン	0.2 g

*した後、攪拌下にさらに⑤の残部を加えて、十分に練り合わせてゲル状軟膏剤を得た。

【0064】

実施例8

①デヒドロパキマ酸	1 g
②カカオ脂	97 g
③卵黄油	2 g
計	100 g

上記の処方に従って①を③に加えて溶解分散させ、これに②を加えて溶解させてから、十分に練り合わせる。さらに金型に充填し、冷却させて1個約1.8gの坐剤を得た。

【0065】

※加えて全量とし、十分に混和して製し、3-〇-アセチル-16 α -ヒドロキシトラメテノール酸を1%含有するローション剤を得た。

【0066】

21

22

(14) pH調製剤

適量

(15)精製水

適量

計

100.0g

上記の処方に従って、原料(2)～(3)を秤量し、80～90℃に加温溶解し、油相とする。原料(9)、(10)を混和し、原料(11)～(13)、(15)を加え、80～90℃に加温、攪拌、溶解し、水相とする。水相に原料(1)、(14)を加え、攪拌下、油相を水相に添加し、ホモミキサーを用いて乳化後、攪拌しながら室温まで冷却し、ポリコ酸Bを1%含有するクリーム剤を得た。

【0067】

実施例11

クッキー

①薄力粉	150g
②マーガリン	80g
③砂糖	70g
④卵	25g
⑤食塩	1.6g
⑥茯苓皮エタノールエキス	2.0g

溶かした②と③をよく混ぜ合わせ、よく混ぜ合わせた④*20

(1) グミ製剤生地調製

①ゼラチン	70g
②砂糖	400g
③水あめ	470g
④クエン酸	13g
⑤1/5濃縮果汁	60g
(ピーチ、グレープ、オレンジ、イチゴ、マスカット等)	
⑥色素	2g
⑦香料	2g

計 1018g

表に示される配合に従い、②を③に混合し、約130℃まで煮詰めた。一方、①をその1.5倍量の水で膨潤させた後、約60℃で加温溶解させておき、これを素早く前述の煮詰めた糖に混合した。これに、別途調製した⑤、④、⑥、⑦の混合溶液を添加して攪拌、混合した後、加水して水分21重量%のグミ生地を調製した。そしてこのグミ生地の温度が低下し(約40℃)固化する直前に、あらかじめ微粉末化した茯苓皮エタノールエキスを下記の表に示す割合で素早く加え、を固体の状態でき均一に分散させ、グミ製剤生地を調製した。

【0069】

茯苓皮エタノールエキス	5g
グミ生地	995g
計	1000g

(2) グミ製剤の固化

次に、十分に乾燥させたコーンスターチをトレーの中に敷き詰め表面を平らにし、グミ製剤を形成する凸型をコーンスターチ表面に押し付けて一個当たり10gを充填できるスターチモールドを準備した。グミ製剤生地を注射器に充填し、先に作成したスターチモールド中に10

*を攪拌しつつ加え、さらに300メッシュの網でふるった①を混ぜながら加えた。さらに⑤、⑥を混ぜながら加えた。これを手で練り棒状にしてラップで包み冷蔵庫で1時間寝かした。これを5mmの輪切りにしてオーブンで170℃、20分間焼いた。

【0068】実施例12

10 グミ製剤

茯苓皮エタノールエキスを含有したグミ製剤を以下のようにして製造した。

gずつ定量的にデポジットした。よって、グミ製剤一個あたりに含有される茯苓皮エタノールエキスの量は50mgとなった。

【0070】室温で約24時間エージングして固化させた後、グミ製剤をスターチモールドから取り出しオイルコーティングした。エージング中にグミ製剤の水分含量は減少し、18重量%となった。水分は変化してもグミ製剤一個当たりの茯苓皮エタノールエキスの含有量は50mgである。また、グミ製剤のAw(水分活性)は20℃で0.68であり、常温で流通、保存しても問題のない値であった。

【0071】実施例13

グミ製剤

スプレードライにより造粒した茯苓皮エタノールエキスを含有したグミ製剤を次のようにして製造した。まず、茯苓皮エタノールエキス100gおよびグラニュー糖20gを水1000gに懸濁または溶解した。この懸濁液をスプレードライ(スプレードライヤー L-8型:大川原化工機社製)し、乾燥粉体76gを得た。この乾燥粉体7.2gおよびグミ生地992.8gを用い、実施例

12と同様にしてグミ製剤生地を調製した。次いで、このグミ製剤生地5gずつをスターチモールド中にデボジットし、茯苓皮エタノールエキス30mgを含有するグミ製剤を得た。

【0072】実施例14

茯苓皮エタノールエキス入り飴（キャンディー）の製造
水飴77.48kg、グラニュー糖66.71kg、茯苓エタノール抽出エキス0.94kgおよび黒糖14.84kgを配合加熱器を用いて102～109℃にて溶解した。60℃にて30分攪拌し、バキュームクラッカーで水分が2%になるまで濃縮した。これに少量の香料を加えて取りナベ中で混合し、冷却機を用いて冷却後混和した。パッチロールおよびサイジングローラーで圧延し、スタンピングマシンを用いて成型して冷却コンベアで室温まで冷却した。金属探知機にかけた後、目視検査をした。これに、グラニュー糖22.2kg、色素少量、アラビアゴム0.18kgおよびその他のものを加えてシロップ調整して糖衣した。室温で1時間放置して乾燥させて艶出させ、室温で一夜放置して乾燥させて目視検査した。茯苓皮エタノールエキス入り飴（キャンディー）約163kgを得た。

【0073】実施例15

茯苓皮エタノールエキス入りクッキーの製造
三温糖20kgおよびショートニング10kgを秤量して攪拌および混合した。これに茯苓皮エタノールエキス1kgおよび甘味料0.2kgおよび適量の香料などの液体原料類を加え、攪拌および混合し、大豆タンパク16kg、大豆繊維4kgなどのその他の原料類20kgを加え、再度攪拌および混合した。これに卵20kgおよび小麦粉30kgを加えて練り合わせて生地を作成した。生地を厚さ4mmのローラーにかけて、成型器で型を抜く。型抜きしたものをバンドオープンに入れて、180℃で15分間焼き上げた。冷却後約100kgの茯苓皮エタノールエキス入りクッキー100kgを得た。

【0074】実施例16

茯苓皮エタノールエキス入り無糖チューインガムの製造
通常使用される味ガムベースは、天然樹脂10～30重量%、酢酸ビニル樹脂10～30重量%、合成ゴム10～30重量%、エステルガム5～20重量%、ワックス

類10～40重量%、乳化剤1～10重量%および充填剤5～20重量%等の割合で使用される。このガムベースに砂糖、ブドウ糖、水飴等の糖類、栄養素および香料などを加え、常法により混合される。香料としては天然香料、合成香料などの油脂香料が適当であるが、特に限定されない。例えば、ミント系香料（ペパーミント、スペアミント、メントール等）、フルーツ系香料（シトラス、ミックスフルーツ、ストロベリー、グレープ、チェリー等）、スパイス系香料（シナモン、クローブ、アニートール、リコリス、シソ、ローズマリ他）等が挙げられる。

【0075】チューインガムの製造工程は、公知の方法に従って良い。例えば、一般にガムの原料を混合練成し（ガム仕上がり温度40～60℃）、適宜の厚さと幅で押し出し、ロール圧延後、冷却、裁断、熟成などの工程によって製造される。

【0076】上記の通常使用されている味ガムベース95kg、軟化剤2kg、色素1kg、香料1kgおよび茯苓皮エタノール抽出エキス1kgをミキサー内で約20分間十分混合練成し（ガム仕上がり温度50℃）、ついで、エクストリーダ（練成押し出し機）内のスクリュで再び練りながらシート状に押し出し、冷風で約10℃に冷却後、パウダーシュガーをかけ、ついで、連続的に圧延ロールにかけ、最終的に1.2mmの厚さに延ばした。ロールカッターでシートをガムの長手方向の幅約72mmに切断し、温度20～25℃、湿度45～55%のエージングルームにて約15時間貯蔵・熟成させて品質を安定させた。その後、小さな短冊型（72mm×19mm）に切断し、重さ3.2g、厚さ1.2mmの茯苓皮エタノールエキス入りガム約96kgを得た。

【図面の簡単な説明】

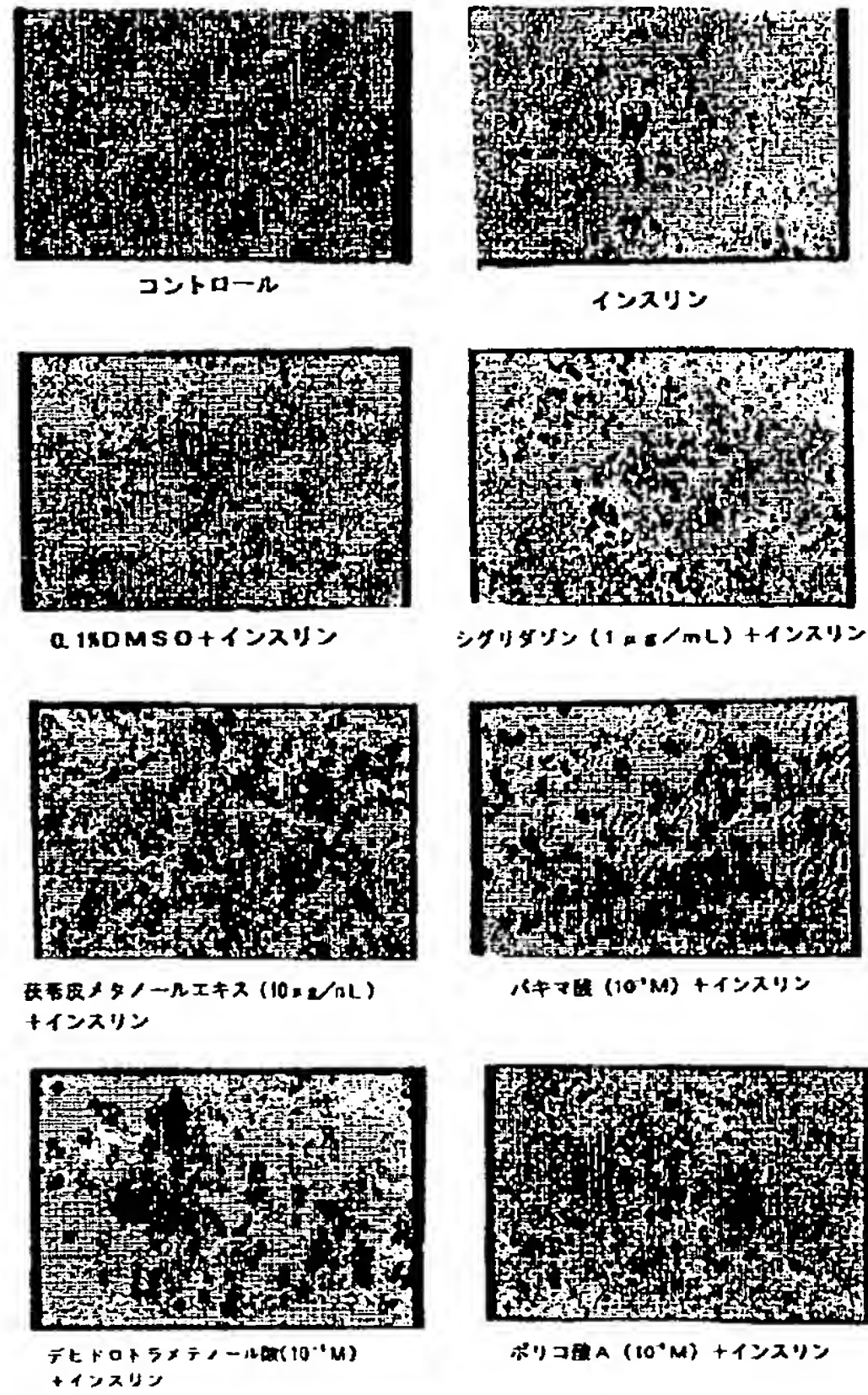
【図1】 本発明の化合物のST-13前脂肪細胞に対する分化誘導活性に与える影響を示す顕微鏡写真である。

【図2】 本発明の化合物のST-13前脂肪細胞に対するインスリンの分化誘導活性に与える影響を示す棒グラフである。

【図3】 本発明の化合物自体のST-13前脂肪細胞に対する分化誘導活性を示す棒グラフである。

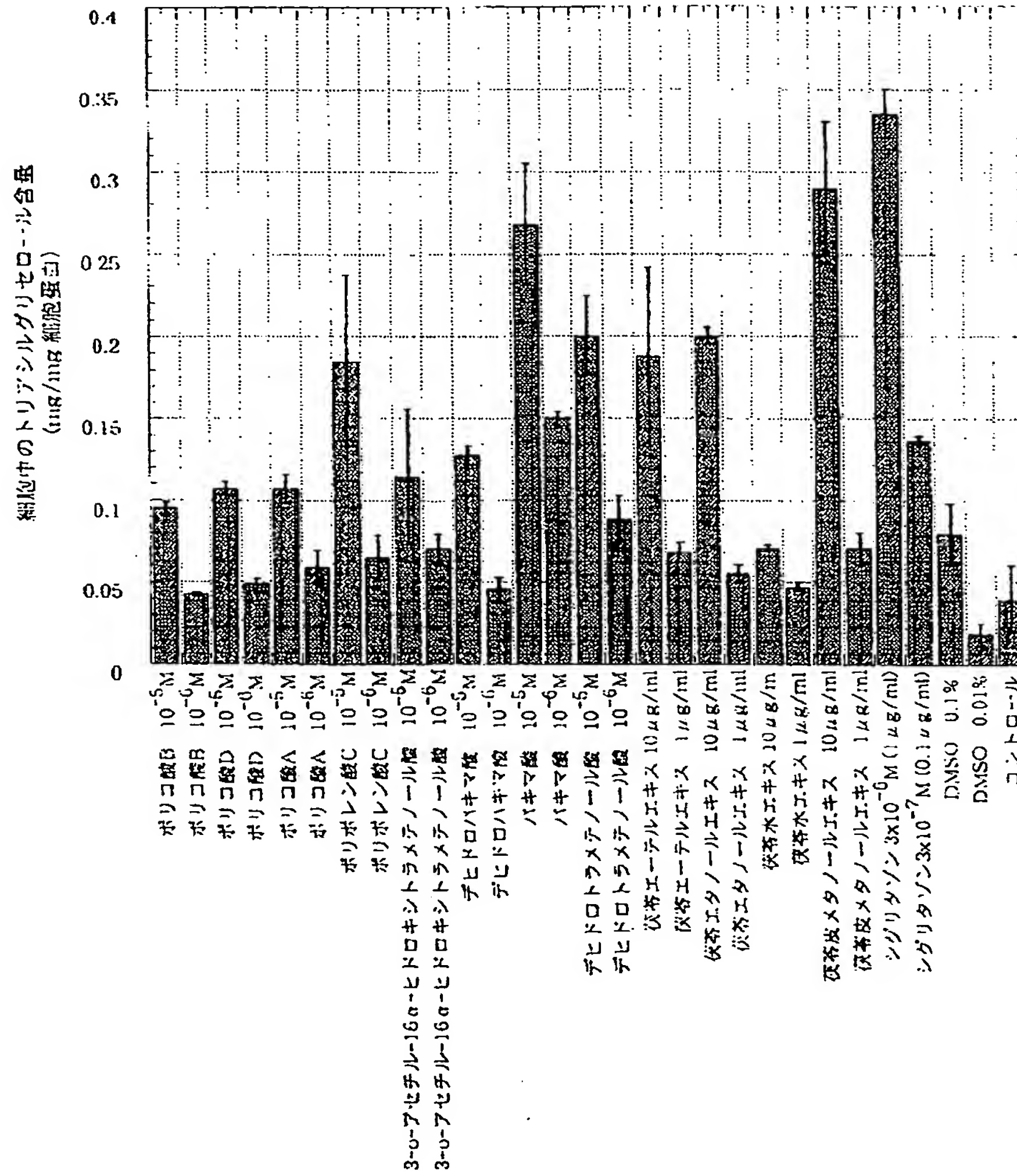
【図1】

茯苓成分の前脂肪細胞に及ぼす影響

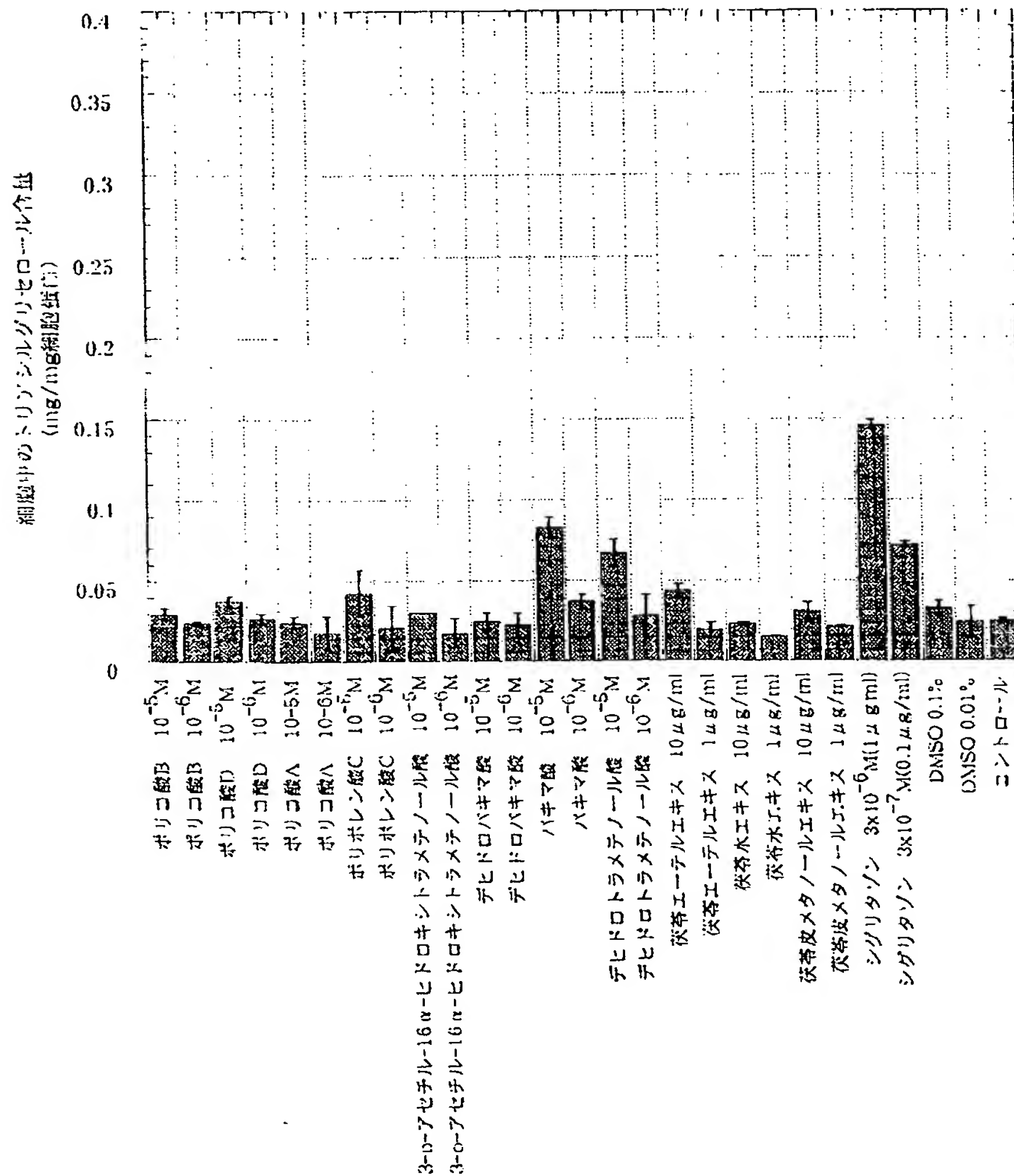


【図2】

インスリン添加



インスリン無添加



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 0 7 C 62/38		C 0 7 C 62/38	
69/16		69/16	
69/732		69/732	Z
C 0 7 J 9/00		C 0 7 J 9/00	
// A 2 1 D 13/08		A 2 1 D 13/08	
A 2 3 G 3/00	1 0 1	A 2 3 G 3/00	1 0 1
3/30		3/30	
A 6 1 K 35/84		A 6 1 K 35/84	A

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)